

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 21720061152223

UDC \_\_\_\_\_

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

腺病毒 DDEFL1 shRNA 干涉载体的构建以及  
DDEFL1 生物学功能的初步探讨

Construction of DDEFL1 shRNA Recombined Adenoviruses  
and Preliminary Investigations on the Biology of DDEFL1

孔芳

指导教师姓名: 杨云青 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2009 年 月 日

论文答辩时间: 2009 年 7 月 23 日

学位授予日期:

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

年 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的  
研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表  
的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规  
范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )  
课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)  
经费或实验室的资助,在( )实验室完成。

(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,  
未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

200 年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于  
年    月    日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

200    年    月    日

# 目 录

摘要.....	1
Abstract.....	3
缩略语对照表.....	5
第一章 前言.....	6
1. ARF 蛋白和 ARF-GAP 蛋白.....	6
2. ARF-GAPs 的酶学特异性.....	9
3. AZAPs 的研究进展.....	10
4. DDEFL1 概述.....	12
5. 本研究的目的、内容和意义.....	15
第二章 材料与方法.....	17
1. 实验材料.....	17
2. 实验方法.....	19
第三章 结果与分析.....	36
1. DDEFL1-shRNA 真核表达载体 pSilencer-DDEFL1-shRNA 的构建.....	36
2. 腺病毒表达载体 pAd-DDEFL1-shRNA 的构建.....	37
3. 腺病毒包装.....	46
4. Ad-DDEFL1-shRNA 显著抑制细胞中 DDEFL1 表达.....	48
5. 腺病毒介导的 DDEFL1 RNAi 显著抑制 H1299、HepG2、HeLa 细胞的迁移.....	50
6. DDEFL1 RNAi 对细胞增殖、细胞周期的影响.....	52
7. DDEFL1 与 p53, Erk 的相互影响.....	55
第四章 讨论.....	59
参考文献.....	66
致谢.....	72

## Table of Content

Abstract in chinese .....	1
Abstract .....	3
Abbreviations .....	5
Chapter I Introduction .....	6
1. ARF protein and ARF-GAPs .....	6
2. Substrate specificity of ARF GAPs .....	9
3. Research progress of AZAPs .....	10
4. Summary of DDEFL1 .....	12
5. Aim and scientific significance of this study .....	15
Chapter II Materials and Methods .....	17
1. Materials .....	17
2. Experimental methods .....	19
Chapter III Results and Analysis .....	36
1. Construction of pSilencer-DDEFL1-shRNA vector .....	36
2. Construction of pAd-DDEFL1-shRNA vector .....	37
3. Packaging recombinant adenoviruses .....	46
4. DDEFL1 was knocked down by DDEFL1 RNAi .....	48
5. RNAi knock down of DDEFL1 significantly attenuate the ability of cell migration of H1299, HepG2 and HeLa cells .....	50
6. Effect of DDEFL1 RNAi on cell proliferation and cell cycles .....	52
7. p53, Erk and DDEFL1 .....	55
Chapter IV Discussion .....	59
References .....	66

## 摘要

DDEFL1 又名 UPLC1、ACAP4、ASAP3, 是 ARF-GAP 家族的一个新发现的成员。与该家族的大部分成员一样, 该蛋白具有 BAR、PH、GAP 和 ANK 等多个结构域, 可能在细胞内囊泡运输、细胞骨架组装、细胞生长、细胞迁移等方面发挥着重要的作用, 并有可能为低营养以及低氧分压下的细胞生长提供有利条件。研究表明, DDEFL1 在一些人肝细胞癌中超量表达, 而且利用反义 S-寡聚核苷酸抑制 *DDEFL1* 的表达可显著抑制 SNU423 肝肿瘤细胞的生长。在宫颈癌 HeLa 细胞和乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中, siRNA 介导的 *DDEFL1* 敲降显著降低了细胞的迁移能力。人的肝和肺是 DDEFL1 表达水平较高的两个组织。

在本研究中, 我们设计并化学合成了三对 DDEFL1-shRNA 用于构建真核表达载体 pSilencer-DDEFL1-shRNA, 然后 PCR 扩增出含有 H1 promoter + DDEFL1-shRNA 的 RNAi 表达框, 并将表达框分别插入 pAd-Track, 然后通过同源重组的方式得到腺病毒载体 pAd-DDEFL1-shRNA, 最后经过 AD293 细胞包装, 得到携带 DDEFL1-shRNA 的重组腺病毒 Ad1、Ad2、Ad3 和携带一段随机序列的阴性对照腺病毒 Ad4。我们利用这些重组腺病毒感染细胞后, 采用半定量 RT-PCR 和 Western 印迹分别检测 DDEFL1 mRNA 和蛋白表达水平。最后, 我们还利用划痕损伤实验, MTT 和流式细胞技术分别检测了 DDEFL1 被敲降后对细胞迁移能力, 细胞生长增殖以及细胞周期分布的影响。

我们的 RT-PCR 和 Western 印迹研究显示, 肝癌 HepG2 和肺腺癌 H1299 细胞有相当丰富的 DDEFL1 mRNA 和蛋白质表达。病毒感染实验显示, 三个克隆的 DDEFL1-shRNA 重组腺病毒在 HepG2 和 H1299 细胞中不同程度地降低了感染细胞的 DDEFL1 mRNA 或蛋白质, 其中以 Ad3 的敲降效果最为明显。与对照组相比, Ad3 细胞感染在 HepG2 中导致 *DDEFL1* mRNA 下降 67% ( $P < 0.002$ ) 蛋白下降 61% ( $P < 0.05$ ), 在 H1299 细胞中 DDEFL1 蛋白的表达下降了 75% ( $P < 0.05$ )。在正常的丰富培养基中, DDEFL1 的敲降对 HepG2 和 H1299 细胞的生长和细胞周期分布没明显的影响。与此相比, DDEFL1 的表达可能可以为低血清营养条件下的细胞生长提供有利条件。划痕损伤实验显示, 与对照组相比, H1299 和 HepG2

细胞感染 Ad3 之后细胞迁移能力都有明显的降低, 但以 H1299 的作用效果更加明显。

**关键词:** DDEFL1, 腺病毒, RNAi

厦门大学博士论文摘要库

## Abstract

DDEFL1 also referred to as UPLC1、ASAP3 and ACAP4, is a new member of the ARF-GAPs family. Like other ARF-GAPs, DDEFL1 contains the BAR, PH, GAP domains and the ANK repeats. Previous studies indicated that DDEFL1 might play pivotal roles in cell migration, vesicle transport, cell skeleton rearrangement and cell proliferation, and might also offer growth advantage to cancer cells under poor nutritional and hypoxic conditions. It has been reported that DDEFL1 was highly up-regulated in several human hepatocellular carcinoma. Conversely, reduced DDEFL1 expression by transfection with anti-sense S-oligo nucleotides inhibited the growth of hepatic SNU423 cancer cells. Several reports also demonstrated the important function of DDEFL1 on cell migration. Knockdown of DDEFL1 expression by siRNA significantly attenuated cell migration of HeLa and MDA-MB-231 cells. DDEFL1 has been detected in human liver and lung.

We have designed and synthesized three pairs of DDEFL1-shRNAs and then insert them into pSilencer-3.1 H1-neo, a type of eukaryotic shRNA expression vector. By using PCR, we amplified the RNAi expressing cassette which contained H1 promoter and DDEFL1-shRNA. Further, the cassettes were inserted into pAd-Track vector and then pAd-DDEFL1-shRNA was attained by homologous recombination. Finally, recombinant adenoviruses were packaged in AD293 cells and we got three recombinant adenoviral vectors expressing DDEFL1-shRNA (Ad1, Ad2 and Ad3) and a negative control containing scrambled sequence (Ad4). To further investigate the roles of DDEFL1 in cell migration, proliferation and cell cycles, we knocked down DDEFL1 level of HepG2 and H1299 cells by adenoviral mediated DDEFL1 RNAi. RT-PCR and Western Blot were applied to determine *DDEFL1* mRNA and protein level, respectively. Then we used wound healing assay to measure cell migration activity. MTT and flow cytometry were used to determine cell proliferation, cell cycles and apoptosis.

Our RT-PCR and Western Blot showed that DDEFL1 was significantly expressed in both HepG2 and H1299 cell lines. Transduction with recombinant adenoviruses containing DDEFL1-shRNA could reduce mRNA level and protein level of DDEFL1 in HepG2 and H1299 respectively. Among three shRNA recombinant viruses, Ad3 has the best effect on reducing DDEFL1 expression and suppressed the DDEFL1 mRNA



level by 67% ( $P < 0.005$ ) in HepG2, and suppressed the DDEFL1 protein level by 61% ( $P < 0.05$ ) and 75% ( $P < 0.05$ ) in HepG2 and H1299 respectively while Ad4 has no evidence effect on DDEFL1 expression. Reduction of DDEFL1 expression had no effect on cell proliferation and cell-cycle of H1299, but the expression of DDEFL1 could provide a growth advantage to cancer cells in low glucose nutritional. Furthermore we found that adenovirus mediated DDEFL1 RNAi inhibited migration of H1299 obviously, H1299 with reduced DDEFL1 migrate into the wound is much slow than Ad4 traded or control cells, and similar results were obtained in HeLa and HepG2 cells.

**Key words:** DDEFL1, adenovirus, RNAi

## 缩略语对照表

缩略语	英文	中文
ACAPs	ARF-GAP containing Coiled-coil, ANK repeats and PH domain	
ARF	ADP ribosylation factor	ADP 核糖基化因子
ASAPs	ARF-GAP containing SH3, ANK repeats and PH domain	
BAR	Bin, amphiphysin and Rvs161/167	
CDRs	Circular dorsal ruffles	
dsRNA	Double strand RNA	双链 RNA
EGF	Epidermal Growth Factor	表皮生长因子
FAs	Focal Adhesions	粘附焦点
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
GAPs	GTPase Activating Protein	GTP 酶活化蛋白
GEFs	Guanine nucleotide Exchange Factors	鸟苷交换因子
GLD	GTP-binding protein-like domain	
HCC	Hepatocellular carcinoma	肝细胞癌
NSCLC	Non small cell lung cancer	非小细胞肺癌
PDGF	Platelet-derived growth factor	血小板衍生生长因子
RISC	RNA induced silencing complex	RNA 诱导的沉默复合体
RNAi	RNA interference	RNA 干扰
shRNA	Small hairpin RNA	小发夹 RNA
siRNA	Small interfering RNA	小干扰 RNA

## 第一章 前言

DDEFL1 (Development and Differentiation Enhancing Factor-Like 1) 又名 UPLC1 (Up regulated in liver cancer 1), ACAP4 (ARF-GAP containing Coiled-coil, ANK repeats and PH domain 4) 或 ASAP3 (ARF-GAP containing SH3, ANK repeats and PH domain 3), 是 ARF (ADP ribosylation factor) -GAPs (GTPase Activating Proteins) 家族的一个新发现的成员。2003 年, 日本学者 Okabe 等人首次发现 DDEFL1 在肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 中超量表达<sup>[1]</sup>。与该家族的大部分成员一样, 该蛋白具有 BAR、PH、GAP 和 ANK 等多个结构域。ARF-GAP 是细胞内重要的物质转运调节分子, 可与鸟苷结合小蛋白相互作用, 进而在细胞内囊泡运输、细胞骨架的组装、细胞生长、细胞迁移等方面发挥着重要的作用, 并有可能为低营养以及低氧分压下的细胞生长提供有利条件。

### 1. ARF 蛋白和 ARF-GAP 蛋白

以 Ras 和 Rho GTPase 超家族为代表的鸟苷结合小蛋白是调控细胞分裂、分化和存活等基础生物学过程的信号转导途径的重要组成部分, 这些鸟苷结合小蛋白因它们与鸟苷交换因子 (Guanine nucleotide Exchange Factors, GEFs) 以及 GTP 酶活化蛋白 (GTPase Activating Protein, GAPs) 的相互作用, 在带有 GTP 的活化构象和带有 GDP 的失活构象之间循环切换。这一有调节的循环切换使得它们成为一些分子转换开关 (Molecular switches), 通过带有 GTP 的活化构象蛋白分子与特定的效应分子 (Effector molecules) 的相互作用, 向信号传导网络传递信息<sup>[2-4]</sup>。ADP 核糖基化因子 (ADP ribosylation factors, ARFs) 是 Ras GTP 酶超家族中的一个家族, 是真核细胞中广泛表达且高度保守的 GTP 结合蛋白家族, 分子量约 20 KD。哺乳动物中, ARF 至少有六种异构体 (Isoforms), 其中 ARF2 在人体中缺失<sup>[5]</sup>。从一级结构上的差异可以将 ARFs 分为三类: 细胞内含量最多的 ARF1-3 (Class I) 负责内质网和高尔基体间的蛋白运输; 相对较为少量的 ARF4-5 (Class II) 和 ARF6 (Class III) 在胞吞 (Endocytosis) 和胞吐 (Exocytosis) 以及细胞伸展等方面起一定作用。ARFs 受 GEFs 以及 GAPs 的调节, GEFs 通过催化使结合在 ARF 上的 GDP 置换成 GTP 而激活 ARF, GAPs 则将结合在 ARF

上的 GTP 水解成 GDP 而使 ARF 失活。ARF 级联信号传导 (ARF signaling cascades) 在细胞内物质转运、囊泡运输、细胞骨架调控、细胞粘附等过程中扮演着重要的角色<sup>[3, 6-8]</sup>, 另外还可能在原肠胚形成过程中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。由于 GTP 酶在细胞骨架组织、基因表达、细胞周期进程等生物学过程中的重要作用, Ras 和 Rho 蛋白的异常表达经常与肿瘤发生与发展联系在一起。

如前所述, GAPs 通过将结合在 ARF 上的 GTP 水解成 GDP 而使 ARF 失活, 是调控 ARF 活性的重要因子。目前为止, 在人类中共发现 31 个基因编码 ARF-GAP<sup>[10]</sup>。根据结构特征可将这些蛋白分成两种类型, 第一类是 GAP 结构域分布在 N-端的称为 ARF-GAP1。ARF-GAP1 可再分成 ARF-GAP1 与 Gits 两种类型。

第二类含有 PH、GAP 与 ANK 重复, 称为 AZAP (ARF GAP with ANK repeats and PH domain) 型。AZAP 来源于每个结构域单个字母的缩写, AZAP 代表 ARF-GAP 带有 ANK 重复结构域与 PH 结构域, Z 代表亚型中特有的一个结构域, 可以根据其它的结构特征再将十二个 AZAPs 分成四个亚型<sup>[6]</sup> (图 1-1)。

ASAPs 包含 ASAP1/DEF1/DDEF1/centaurin  $\beta$ 4/AMAP1, ASAP2/PAP/AMAP2 和 DDEFL1/ASAP3/UPLC/ACAP4 三个成员, 因 ASAP1 和 ASAP2 蛋白中 C 末端的 SH3 结构域而命名, 另外 N 末端还包含一个 BAR (Bin, amphiphysin and Rvs161/167) 结构域, C 端还有三个脯氨酸丰富区域 (SKKRPPPPPGHKRT)<sup>[6]</sup>。此外, ASAP1 还有一个 8 单位串联重复的 E/DLPPKP 结构域。ASAP3 即为 DDEFL1/UPLC1/ACAP4, 它不具有 C 端的 SH3 结构域, 但它含有 BAR, PH, ARF-GAP 和 ANK 重复。而且, 根据一级结构分析、高度保守的 ARF-GAP 结构域分类学分析, 该蛋白在一级结构上与 ASAP1 相似度达 50%, 因此通常将此蛋白划为 ASAPs 家族<sup>[11]</sup>。

ACAPs 的中的“C”代表它 N 端的 coiled-coil 结构。ACAP1/2 的 coiled-coil 区域形成 BAR 结构域, 该区域与寡膈蛋白 (oligophrenin) 有同源性。KIAAI716 可能编码第三个 ACAPs 型蛋白。

AGAPs 的 N 端有一个 GLD (GTP-binding protein-like domain) 结构域并因此而得名。GLD 结构域包括 GXXXXGKT/S, DXXG 及 TSAT (X 代表任意一种氨基酸) 三个保守的 GTP 结合基序, 但没有与鸟苷环结合的 NKXD 序列。另外一

个特征是 AGAPs 的 PH 结构域是断裂的，有一段 80-100 个氨基酸的序列被插入到 5 与 6 之间的  $\beta$  带中，在 AGAP1 中有 189 个氨基酸被插入 PH 结构域<sup>[12]</sup>。

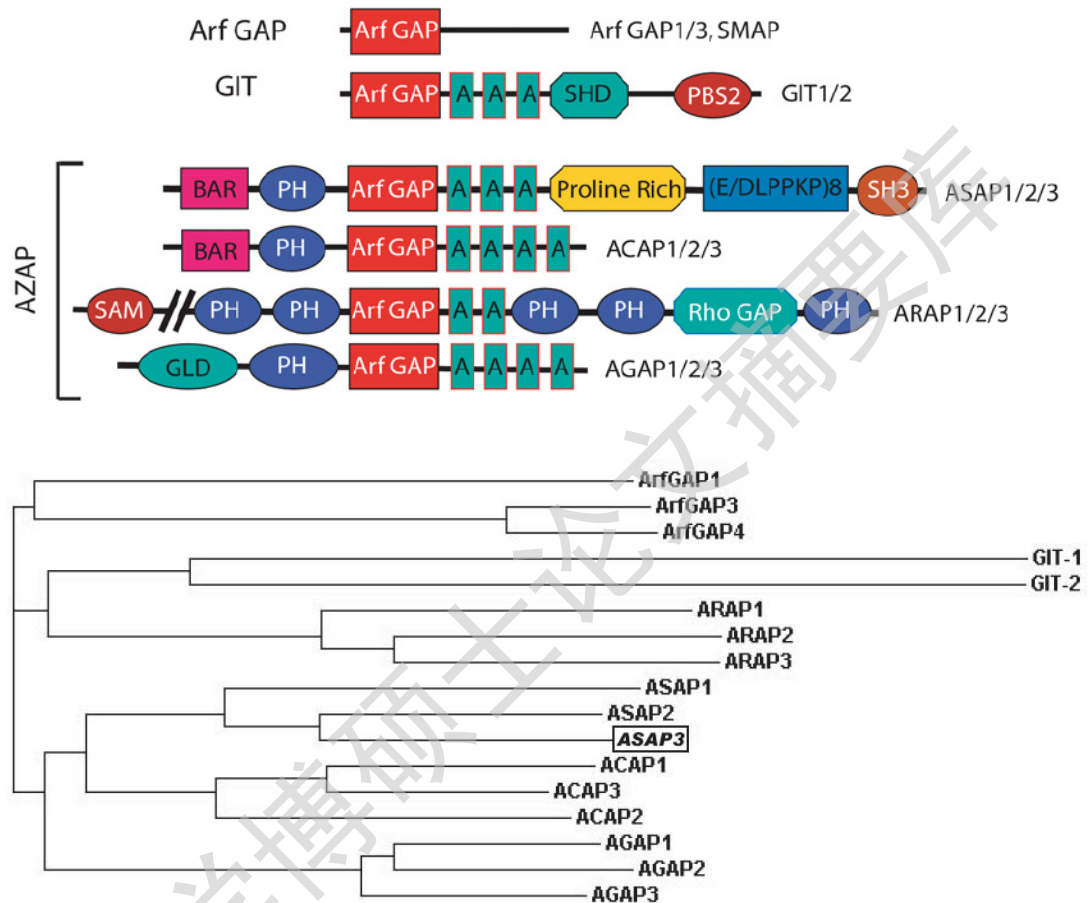


图1-1: ARF-GAP蛋白分类<sup>[6, 11]</sup>

Fig. 1-1 Schematic representation of ARF-GAP proteins

ARAPs 是已知的最大的 ARF-GAP 蛋白，有一个 Rho GAP 结构域，每个成员都有五个 PH 结构域，其中两个 PH 结构域与磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸 (phosphatidyl inositol 3, 4, 5 triphosphate, PIP3) 结合基序有 60%-80%的一致。在 N 端还有一个 SAM(sterile  $\alpha$ -motif) 结构域。该家族蛋白多样性主要表现在 Rho GAP 区域，ARAP2 中一个谷氨酰胺残基可活化 Rho GAP，而在 ARAP1/ARAP3 中发挥同样功能的则为精氨酸。另外 ARAP1 有一个 Ras 相关的结构域，ARAP2 有一个与 rbal3 的 switch2 区同源区域。

其他一些蛋白也包含有 ARF-GAP 结构域，如 Centaurin  $\alpha$ 1/2 和 RIP/Hrb (Rev-interacting protein/HIV-1 Rev-binding protein)。Centaurin  $\alpha$ 1 在脑组织中有丰富的

表达<sup>[13]</sup>, Centaurin  $\alpha 2$ 则在脂肪组织、心肌、骨骼肌中表达<sup>[14]</sup>。

## 2. ARF-GAPs 的酶学特异性

体内外的研究表明 GAP 蛋白对底物有选择性。多数实验中使用 ARF1, ARF5 与 ARF6 作为代表, 各种 ARF-GAP 的底物特异性如表 1-1 所示。ARF-GAP1 是第一个检测的 GAP 蛋白<sup>[15]</sup>, 体外的 GAP 酶活性表现为 ARF1 > ARF5 > ARF6, 体内也是 ARF1 特异的。过表达 ARF-GAP1 引起高尔基体的解聚。另一个 ARF1 的 GAP 是 AGAP1, 在体内的功能与 ARF-GAP1 不同。体外实验 AGAP1 的底物有明显的偏好性, 表现为 ARF1 > ARF5 > ARF6, 体内它调节 ARF1 效应子 AP-3 的功能<sup>[12]</sup>。Casanova 等人发现过表达 AGAP1 降低 ARF1-GTP 水平, 但明显的促进 ARF6-GTP 水平, 另外过表达缺失 GAP 活性的突变体 AGAP1 (R599K) 比表达 AGAP1 使 ARF6-GTP 水平升高 2.5-8 倍, 并且这些现象是 ARF6 特异性的。AGAP1 的 GAP 结构域作用于 ARF1, 但可以通过其他的结构域增强 ARF6 活性, 这两种功能都依赖于 AGAP1 N 端的 GLD 结构域<sup>[16]</sup>。

表 1-1: 各种 ARF-GAPs 的底物特异性<sup>[6]</sup>

Table 1-1 Substrate specificity of ARF-GAPs

Arf GAP	<i>In vitro</i> substrate	Reference	<i>In vivo</i> substrate	Reference
Git1	Arf1, Arf6*†	Vitale et al., 2000	Arf6*	Nishiya et al., 2005
Git2	Arf1, Arf6*†	Vitale et al., 2000	Arf1*	Mazaki et al., 2001
ASAP1	Arf1, Arf5†	Brown et al., 1998	Arf1*	Furman et al., 2002
				Liu et al., 2004
ASAP2	Arf1, Arf5†	Andreev et al., 1999	Arf6	Hashimoto et al., 2004b
				Uchida et al., 2001
ASAP3	Arf5	V.L. Ha and P.A. Randazzo, unpublished data	Arf5	V.L. Ha and P.A. Randazzo, unpublished data
ACAP1	Arf6	Jackson et al., 2000	Arf6	Jackson et al., 2000
ACAP2	Arf6	Jackson et al., 2000	Arf6	Jackson et al., 2000
ACAP3	ND		ND	
ARAP1	Arf1, Arf5†	Miura et al., 2000	ND	
ARAP2	Arf6	Yoon et al., 2006	Arf6	Yoon et al., 2006
ARAP3	Arf5	Stacey et al., 2004	Arf6§	Krugmann et al., 2006
	Arf6‡	Krugmann et al., 2002		

The ARF specificity of the indicated ARF-GAPs is listed. In most cases, the specificities are based on single reports and remain to be independently corroborated. ARF1, ARF5 and ARF6 were compared in most studies as representatives of Class 1, 2 and 3 ARFs. \*, ARF5 was not included in the comparison; †, similar activity against indicated ARFs; ‡, epitope tagged ARFs used as substrates; §, comparisons were not made, ARF6, but neither ARF1 nor ARF5, was examined; ND, not determined.

ASAP1/2 的体外活性表现为  $ARF5 > ARF1 > ARF6$ ，其中对  $ARF1$  的活性要比  $ARF6$  高出 200 倍以上。ASAP1 与 ASAP2 在细胞的外周也有功能，有时与  $ARF6$  共定位。但 ASAP1 不能抑制  $ARF6$  的功能，过表达 ASAP1 减少  $ARF1$ -GTP 的水平， $ARF6$ -GTP 反而增加。能结合  $ARF$ -GAP 但不能催化 GTP 水解的 ASAP1 突变体，与  $ARF1$  共定位。ASAP2 在细胞内表现出针对  $ARF6$  的活性<sup>[17-21]</sup>。ASAP3 即 DDEFL1 的体外活性有争议，姚雪彪实验组检测到 DDEFL1 体外活性明显偏好  $ARF6$ <sup>[22]</sup>，而 Randazzo 则表明 DDEFL1 的部分片段 PH-GAP-ANK(287-693 aa) 针对  $ARF5$  的 GAP 活性比  $ARF1$  和  $ARF6$  提高 3-4 倍，全长 DDEFL1 体外活性表现为  $ARF5 > ARF1 > ARF6$ ，其中对  $ARF5$  的活性是对  $ARF1$  活性的 2-3 倍，对  $ARF5$  的活性是对  $ARF6$  活性的 10 倍。Randazzo 指出，姚雪彪实验组实验中使用 GST 标记的  $ARF$  融合蛋白作为底物，GST 是一个分子量为 26 KD 的蛋白，而  $ARF$  分子量仅为 20 KD，GST 可能影响  $ARF$  的空间结构，而导致实验结果差异<sup>[11]</sup>。

以  $ARF6$  作为偏好底物的 GAP 是 ACAP1/2。细胞内过表达 ACAP1/2 能阻断  $ARF6$  诱导的 actin 突起的形成，降低细胞内  $ARF6$ -GTP 的存在<sup>[23, 24]</sup>。Gits 是  $ARF6$  的 GAP，体外 Gits 没有表现出对  $ARF6$  的偏好性，体内  $Git1/2$  与  $ARF6$  在细胞的边缘共定位，以  $ARF6$  作为它的底物。过表达  $Git1/2$  能降低  $ARF6$  调节的 G 蛋白偶联受体的内吞作用。 $Git2$  剪切体  $Git2$ -short，在过表达的情况下以  $ARF1$  作其底物，与  $\beta$ -COP (coatmer protein) 分布相同<sup>[15]</sup>。

ARAPs 各成员的底物特异性不同。ARAP1 在体外的活性检测中表现为  $ARF1 = ARF5 > ARF6$ ，而 ARAP3 的底物特异性表现为  $ARF5$ 。也有文章指出 ARAP3 以  $ARF6$  作为它特异性底物，利用 RNAi 敲降 ARAP3，导致  $ARF6$ -GTP 水平升高。体内外实验中 ARAP2 的偏好底物为  $ARF6$ <sup>[3, 6, 15]</sup>，但 Casanova 的研究发现体内 ARAP1 活性主要表现为  $ARF6$ ，而且受到 N 端 sterile  $\alpha$  motif 参与的某种机制调节<sup>[16]</sup>。

### 3. AZAPs 的研究进展

AZAPs 的多个成员最近被发现在多种肿瘤组织中超量表达，暗示该家族可能与肿瘤的发生转移有密切关系，而且研究发现 ACAPs、ASAPs 和 ARAPs 都能

影响 actin 骨架排布。

ACAP1 又称 Centaurin  $\beta$ 1/KIAA0050, 和 ACAP2 相同, 两者都以 ARF6 为偏好底物, 在细胞外周发挥作用。过量表达 ACAP1 和 ACAP2 明显影响 ARF6 的分布, 而对 ARF1、ARF5 的分布没有影响。在 HeLa 细胞中过表达 ACAP1 或 ACAP2 能抑制 ARF6 依赖的突起形成, 且 ARF6 定位在管状的内吞体结构上<sup>[24]</sup>。ACAP1 能直接与转铁蛋白受体 TfR 胞质尾端的回收分选信号 (两个独立的苯丙氨酸基序) 结合, 促进 Transferin 受体回到质膜, RNAi 抑制 ACAP1 的表达阻碍这一过程<sup>[23]</sup>。另外 ACAP1 可能通过调节 integrin  $\beta$ 1 进而调控 actin 分布, 这种调节是以 ACAP1 被 Akt 磷酸化为前提。减少 ACAP1 表达会影响 integrin 的回收, ACAP1 的突变体 S554A 或 S724A (S554 为 Akt 磷酸化位点) 不能和 Akt 相互作用, 从而不能结合和回收 integrin, 而 S554D 或 S724D 可使 ACAP1 和 integrin  $\beta$ 1 持续性结合。另外添加 Akt 抑制剂或抑制 PI3K 活性都会破坏 ACAP1 和 integrin  $\beta$ 1 的相互作用<sup>[25]</sup>。Victor W 等人还指出 ACAP1 是网格蛋白复合体的组成成分, 可在 ARF6 的调节下介导多种物质的膜质运输, 如刺激依赖的 integrin 转运、胰岛素刺激介导的葡萄糖转运通道 4 (Glut4) 转运<sup>[26-28]</sup>。

ARAPs 调节细胞骨架是通过调节 Rho 家族蛋白来实现, 它有 Rho GAP 结构域, 对 RhoA, Rac1 及 Cdc42 有活性。在 NIH3T3 细胞中过表达 ARAP1 抑制应力纤维丝形成, 细胞呈现圆形而不是扁平状, 而失活突变没有这些影响。ARAPs 以不依赖于 RhoGAP 活性的方式调节细胞骨架。过表达 ARAP1 诱导丝状伪足形成, 在 HeLa 细胞中形成 actin 丰富的“水泡”。另外表达 ARAP1 会增强 Cdc42 的活性, Cdc42-GTP 水平上升<sup>[29]</sup>。诱导丝状伪足的形成不依赖于 RhoGAP 结构域, Rho GAP 失活点突变对丝状伪足的形成没有影响, 但 ARAPs 中的 ARF-GAP 的失活抑制丝状伪足的形成<sup>[15]</sup>。

ASAPs 家族是被研究较多的 GAP, 其中针对 ASAP1 的研究最为详细。ASAP1 又称 DDEF1, Centaurin  $\beta$ 4, DEF1, PAG2, KIAA1249, HGNC: 2720, ZG14P, AMAP1 等。人的 *ASAP1* 基因位于染色体 8q24.1-q24.2, 在黑色素膜黑色素瘤、结肠直肠癌、乳腺癌中有超量表达。研究表明 ASAP1 通过活化 ARF-GAP 来调控肌动蛋白与细胞骨架控制细胞运动。ASAP1 参与并调节 FAs (Focal Adhesions)、CDRs (Circular dorsal ruffles) 和侵袭伪足的形成。部分实验表明降低



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库